

长牡蛎两种 *engrailed* 同源基因的鉴定及其与贝壳发育相关性的研究

黄晓红^{1,2}, 郇聘¹, 刘保忠¹

(1. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: *engrailed* 基因属于同源异形基因家族成员, 在许多动物的分节、附肢发育、神经系统发育和贝壳形成过程中发挥作用。本研究克隆了长牡蛎两个 *engrailed* 同源基因, 命名为 *cgi-eng1* 和 *cgi-eng2*。序列分析表明, 两个基因均具备典型 *engrailed* 基因保守的 5 个 EH 结构域。利用整装原位杂交技术检测了 *cgi-eng1* 和 *cgi-eng2* 在贝壳形成的关键时期早期 D 形幼虫时期的表达情况。结果显示, *cgi-eng1* 和 *cgi-eng2* mRNA 高表达于贝壳外缘, 可能与早期贝壳形成过程有关。此外, 两个基因的在贝壳外缘的表达模式亦有区别, 提示两个基因的功能可能存在一定程度的分化。本研究首次系统鉴定了长牡蛎 *engrailed* 基因的成员, 并发现它们可能均参与幼虫贝壳形成, 研究结果有助于加深对贝类早期发育及贝壳形成的理解。

关键词: 整装原位杂交; *engrailed*; 长牡蛎; 发育; 幼虫

中图分类号: Q951+4 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2015)06-0015-06

doi: 10.11759/hyxx20140401001

贝壳是大多数软体动物最显著的特征, 为动物生存提供基本保护。鉴于其重要性, 贝壳发生机制的研究一直是人们关注的热点。显微观察表明, 贝壳发生起始于胚胎发育的早期。早在原肠作用刚刚开始时, 胚胎的背部细胞就开始变形、内陷, 进而分泌贝壳物质, 并在担轮幼虫时期形成最早的贝壳。随后贝壳逐渐扩大并钙化, 至 D 形幼虫时期, 贝壳首次覆盖完整幼虫身体, 完成第一阶段的发育^[1], 此时期的贝壳称作 期胚壳(prodissoconch I)。

贝壳的发生过程依赖多个基因的协同作用。目前该方面是一个研究热点, 受到重点研究的基因包括 *dpp*, *engrailed*, *hox-1* 等^[2-4]。其中 *engrailed* 基因属于同源异形基因家族成员^[5], 具备该家族蛋白典型的同源异形结构域(homeodomain)。与同家族的 HOX 蛋白一样, *Engrailed* 通过其同源异形结构域结合特定 DNA 序列, 作为转录因子发挥调节基因表达的功能。此外, *Engrailed* 还与多种其他蛋白相互作用(如 Pbx 蛋白), 并可发生翻译后修饰调节, 从而增加基因表达调控的多样性水平^[6-7]。作为典型的发育相关基因, *engrailed* 被报道广泛参与节肢动物^[8-11]、棘皮动物^[12]、脊索动物^[10, 13]等的分节、附肢发育和神经系统发育过程。目前, 多个软体动物的 *engrailed* 基因已被报道参与贝壳发生^[3, 14-16]。软体动物 *engrailed*

表达于正在发生的贝壳外缘, 可能调控了贝壳发生的边界^[3, 14-16]。

长牡蛎(*Crassostrea gigas*)是一种在世界范围内广泛分布的经济贝类, 具备广泛的研究基础。同时, 其全基因组数据在 2012 年发布, 使其成为软体动物的一种潜在模式生物。目前长牡蛎贝壳发生相关基因尚未展开系统研究。本研究基于长牡蛎基因组数据库, 鉴定了两个 *engrailed* 同源基因序列, 分析了其系统演化关系, 并对其在贝壳形成关键时期的表达情况进行了研究和比较, 研究结果将有助于加深作者对贝壳形成过程分子调控机制的认识。

1 材料与amp;方法

1.1 幼虫培养及样品固定

性成熟的长牡蛎购自山东省青岛市南山水产市场。选取性腺饱满的个体, 解剖获取配子, 进行人工授精。受精卵在 25~26 °C 条件下进行培养, 持续充

收稿日期: 2014-11-15; 修回日期: 2015-02-27

基金项目: 国家 973 计划项目(2010CB126403); 国家自然科学基金项目(31001102)

作者简介: 黄晓红(1988-), 女, 福建漳州人, 硕士研究生, 研究方向: 贝类发育生物学, E-mail: ysrred@gmail.com; 刘保忠, 通信作者, 电话: 0532-82898696, E-mail: bzliu@qdio.ac.cn

气, 在受精后 14h 收集长牡蛎早期 D 形幼虫, 经 4% 多聚甲醛固定后梯度甲醇脱水, 保存于 -20℃ 中备用。

1.2 *engrailed* 同源基因的克隆

利用已报道的刺牡蛎 *Saccostrea kegaki* 的 *engrailed* 基因(GenBank No. BAG68617.1)序列比对长牡蛎基因组数据库(Blastp), 搜索得到两条 *engrailed* 同源基因序列(OYG_10012208 及 OYG_10012209)。这两个参考序列已包括基因的全长 ORF 部分, 作者设计了全长 ORF 引物 *cgeng1_F* (ATGGATGTTAAACAAAAT AACGCGGAGG)、*cgeng1_R* (TTATGACTCGCCTTCATC CGAAACTGT) 和 *cgeng2_F* (ATGTCGGACGTGAA AGT)、*cgeng2_R* (TCATTGCT CCATCCCATC)。以上述引物进行 PCR 扩增并测序验证, 成功获得两条长牡蛎 *engrailed* 同源基因的全长 cDNA 序列, 并分别命名为 *cgi-eng1* 和 *cgi-eng2*。为了保证扩增反应的特异性, 本研究中所用到的所有 PCR 扩增反应均使用了 Touchdown PCR, 具体程序为: 95℃ 预变性 4 min; 之后为 18 个逐步降低退火温度的循环: 95℃ 变性 15 s, 68℃ 退火 15 s(之后每个循环降低 1℃), 72℃ 延伸 1 min; 然后是 25 个常规 PCR 循环: 95℃ 变性 15 s, 50℃ 退火 15 s, 72℃ 延伸 1 min; 最后 72℃ 延伸 10 min。

1.3 *engrailed* 同源基因序列特征和聚类分析

利用生物信息学工具, 对 *cgi-eng1* 和 *cgi-eng2* 序列和对应的氨基酸序列进行特征分析, 包括通过 ExPASy 网站的在线工具 (<http://web.expasy.org/computepi/>) 分析分子量及等电点; SignalP 网站 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 的工具预测信号肽序列; 利用 SMART 在线工具 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 并结合相关文献报道对 Cgi-Eng1 和 Cgi-Eng2 中的结构域进行预测。利用 Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>) 对不同物种结构域之间的保守性进行比较, 并利用 Neighbor-Joining 方法进行聚类分析。

1.4 整装原位杂交

分别利用基因特异性引物 *cgeng1_wF* (CGGA GGCTGCACACGAAC)、*cgeng1_wR* (GGCGA AGTG GCTACTGGACTAC) 和 *cgeng2_F*、*cgeng2_R*, 通过 touchdown PCR 扩增其 cDNA 序列。将 PCR 产物连接入 pGEM-T 载体(Promega), 转化入大肠杆菌中增殖, 提取质粒。将质粒酶切线性化之后作为模板, 使

用 DIG RNA Labeling Mixture 试剂盒(Roche)合成地高辛标记的 RNA 探针。整装原位杂交流程按照 Maures & Duan 报道的方法进行^[17], 用 Nikon 80i 显微镜观察, 拍照。以正义 RNA 探针作为阴性对照组。

2 结果

2.1 长牡蛎 *engrailed* 同源基因及序列特征

长牡蛎 *cgi-eng1* 基因(GenBank No. EKC23208.1)的 ORF 全长 690bp, 编码一个长 229 个氨基酸多肽(图 1), 其理论分子质量为 25.7ku, 等电点为 9.62。长牡蛎 *cgi-eng2* 基因(GenBank No. EKC23209.1)的 ORF 全长 642bp, 编码一个长 213 个氨基酸的多肽(图 1), 其理论分子质量为 24.3ku, 等电点为 9.43。经过 SignalP 预测, Cgi-Eng1 和 Cgi-Eng2 均没有信号肽序列。结构域预测表明二者均具备典型的同源异形结构域, 在 Cgi-Eng1 中位于第 141 和 203 个氨基酸之间, 在 Cgi-Eng2 中位于第 126 和 188 个氨基酸之间。根据相关的报道^[18-20], 在 Cgi-Eng1 和 Cgi-Eng2 中鉴定到 Engrailed 蛋白全部的 5 个典型结构域(EH1-5)(图 2), 其中 EH4 即同源异形结构域。多序列比较分析发现, EH2 在物种间的保守性最高, EH4 次之, 而其他结构域较低(图 2)。

2.2 聚类分析

作者对来自包括脊椎动物、节肢动物和软体动物的 *engrailed* 同源基因进行了演化分析。结果如图 3 所示, 3 个类群的基因各自聚为一支, 与其演化关系有很好的对应。在软体动物分支内部, 双壳类和腹足类也各自聚为一支。在双壳贝类的 3 种 *engrailed* 同源基因间, *cgi-eng1* 先与刺牡蛎 *S. kegaki* 的 *engrailed* 基因聚成一支, 之后和 *cgi-eng2* 聚在一起。这提示 *cgi-eng1* 和刺牡蛎已报到的 *engrailed* 基因可能是直系同源基因。

2.3 原位杂交

作者在贝壳发生的关键时期——早期 D 形幼虫中, 利用整装原位杂交技术研究了这两个 *engrailed* 同源基因的表达情况。结果显示, *cgi-eng1* 和 *cgi-eng2* 基因 mRNA 均在长牡蛎幼虫贝壳外缘高表达(图 4)。同时作者发现, *cgi-eng1* 和 *cgi-eng2* 的表达模式存在一定差异: *cgi-eng1* 特异性表达于贝壳外缘, 在其他部位检测不到表达; 而 *cgi-eng2* 虽然在贝壳外缘高表达, 但在其他部位亦有广泛的表达。作者在阴性对

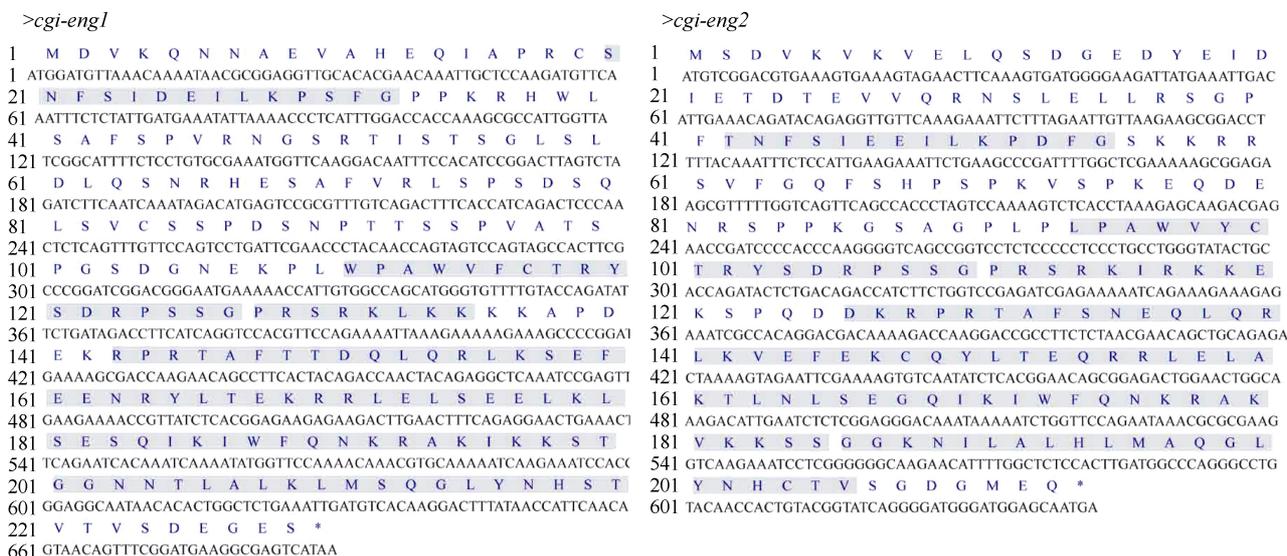


图 1 长牡蛎 *cgi-eng1* 和 *cgi-eng2* cDNA 序列和对应的氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequence of *cgi-eng1* and *cgi-eng2*

图中阴影区域依次是 EH1-5 结构域

The five domains (EH1-EH5) conserved in typical Engrailed proteins are indicated by shaded letters

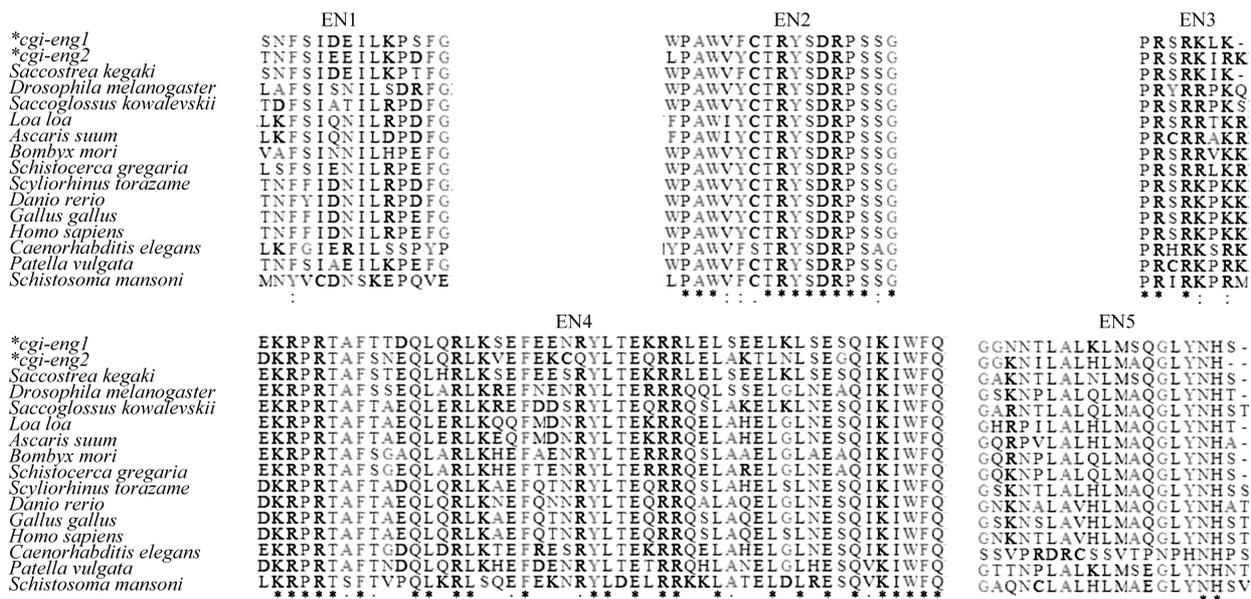


图 2 长牡蛎 *engrailed* 同源基因 EH1-5 结构域的多物种比较分析

Fig. 2 Multiple alignment of the five conserved domains of *cgi-eng1* and *cgi-eng2*

照组(使用正义链探针)没有检测到信号,证实了杂交结果的特异性。

3 讨论

作者从长牡蛎幼虫 cDNA 中克隆到两个 *engrailed* 同源基因 *cgi-eng1* 和 *cgi-eng2*。其氨基酸序列预测结果显示, Cgi-Eng1 和 Cgi-Eng2 的结构高度保守, 包含 5 个结构域。其中 EH4 是同源异形结构

域, 参与蛋白的相互作用。研究结果表明 *Engrailed* 能与 12 种可溶性的核蛋白相互作用^[21]。EH2 和 EH3 能与 Exd/Pbx 蛋白相结合, 增加 *engrailed* 与 DNA 的结合能力; 而 EH1 和 EH5 参与转录抑制的激活^[22]。多序列比对表明 EH2 保守性最高, 这与笠螺 *Patella vulgata* 的分析结果一致^[3]。

由于其功能的重要性, *engrailed* 基因一直发育生物学研究的热点。已有研究结果表明, *engrailed* 基

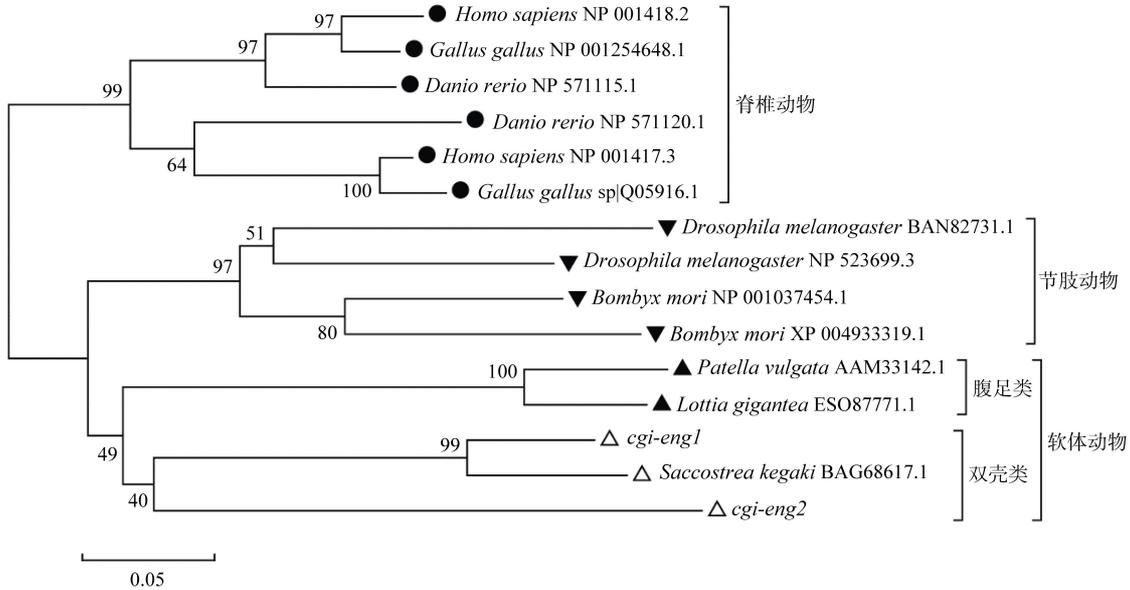


图 3 长牡蛎 *engrailed* 同源基因氨基酸序列的聚类分析

Fig.3 A phylogenetic tree of *cgi-eng1* and *cgi-eng2* constructed through the Neighbor-Joining method
节点处数值代表 1000 次重复抽样所得的 bootstrap 值
The bootstrap values were calculated from 1000 replicates

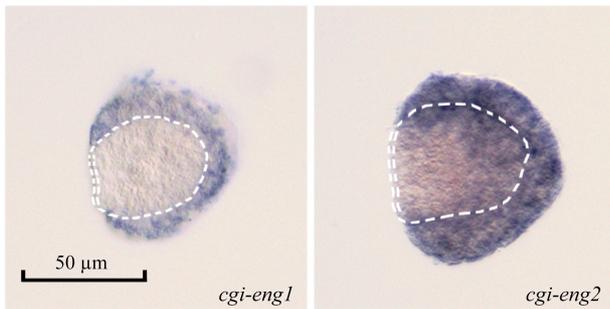


图 4 长牡蛎 *cgi-eng1* 和 *cgi-eng2* 基因 mRNA 在长牡蛎早期 D 形幼虫的分布情况

Fig. 4 Expression patterns of *cgi-eng1* and *cgi-eng2* in early D-veligers (14 hpf)

单虚线和双虚线分别标识的是贝壳外缘和铰合部; 由于该时期幼虫的个体差异已经较为明显, 因此图中所示的两个幼虫尽管处于相同的发育阶段, 但具有不同的个体大小

The shell edge and hinge were indicated by single and double dotted lines, respectively. The two larvae in the figure have different body sizes due to genetic variations, which became obvious in this stage

因是一个古老的后生动物发育相关基因, 在演化过程中发生了多次独立的复制、基因座的丢失及基因功能的分化等事件, 导致出现了大量的旁系同源基因^[22]。目前, 在许多物种中都发现了多个 *engrailed* 基因。而现有软体动物中的研究均只报道了一个 *engrailed* 同源基因^[2, 3]。作者推测, 软体动物可能并非只存在一个 *engrailed* 同源基因, 而是由于基因组信息缺乏的原因导致部分成员尚未鉴定。在本研究

中, 作者系统搜索了长牡蛎基因组数据库, 得到两条 *engrailed* 同源基因序列, 这验证了作者的猜测。此外, 在聚类分析中, 双壳贝类的 *engrailed* 同源基因并不与已报道的腹足类基因单独聚在一起, 提示 *engrailed* 基因在腹足类和双壳类可能经历了单独的演化过程, 这将是今后研究的一个重要问题。

基于软体动物 *engrailed* 基因参与贝壳发生过程的报道^[3, 14-16], 作者着重观察了长牡蛎两种 *engrailed* 同源基因与贝壳发生的相关性。作者选择的早期 D 形幼虫处于贝壳形成的关键时期, 此时贝壳由背部的一个小区域逐渐长大并最终覆盖整个幼虫。Nederbragt 等^[3]首次报道了 *engrailed* 在 *P. vulgata* 中表达于贝壳外缘, 并提出假说认为 *engrailed* 限定了贝壳发生的边界; Kin 等^[2]在 *S. kegaki* 的早期 D 形幼虫的研究结果也表明 *engrailed* 分布于贝壳外缘, 与腹足类的结果一致。作者在长牡蛎中的研究表明, 两种 *engrailed* 同源基因均在贝壳外缘高表达, 与前人结果一致, 支持了 *engrailed* 可能参与贝壳发生的观点。

除发现两种 *engrailed* 同源基因均高表达于贝壳外缘外, 作者还发现两种基因的表达模式存在差别。与 *cgi-eng1* 的特异性表达相比, *cgi-eng2* 虽然也分布与贝壳外缘, 但在幼虫其他部位亦有广泛的表达, 提示其不仅仅参与贝壳边界的形成过程, 还可能发

挥其他功能。这些功能是否局限于贝壳发生过程，抑或还参于其他早期发育事件，需要进一步的研究以加以佐证。

本研究基于长牡蛎基因组数据库，首次鉴定了长牡蛎的两种 *engrailed* 同源基因，展示了其与贝壳发生的相关性，并提出二者可能存在功能差异。在下一步的工作中，深入解析 *engrailed* 同源基因在贝壳发生中的具体功能，及不同 *engrailed* 同源基因的功能差异将是研究的重点内容。此外，本文中作者仅考察了一个关键发育时期的 *engrailed* 基因表达情况，而并未对 *engrailed* 在发育过程中的表达变化情况展开研究。在后续的工作中将有必要系统研究整个早期贝壳发育阶段 *engrailed* 基因的表达情况，比如从担轮幼虫(25~26 °C时约 11 hpf)到完全发育的D形幼虫(约 24 hpf)。这些研究一方面可以验证作者的结论，另一方面还可能发现新的功能提示信息。

参考文献:

- [1] Mouëza M, Gros O, Frenkiel L. Embryonic development and shell differentiation in *chione cancellata* (bivalvia, veneridae): An ultrastructural analysis [J]. *Invertebrate Biology*, 2006, 125(1): 21-33.
- [2] Kin K, Kakoi S, and Wada H. A novel role for *dpp* in the shaping of bivalve shells revealed in a conserved molluscan developmental program [J]. *Dev Biol*, 2009, 329(1): 152-166.
- [3] Nederbragt A J, van Loon A E, Dictus W J. Expression of *Patella vulgata* orthologs of *engrailed* and *dpp-bmp2/4* in adjacent domains during molluscan shell development suggests a conserved compartment boundary mechanism [J]. *Dev Biol*, 2002, 246(2): 341-355.
- [4] Samadi L, Steiner G. Involvement of hox genes in shell morphogenesis in the encapsulated development of a top shell gastropod (*Gibbula varia l.*) [J]. *Development genes and evolution*, 2009, 219(9-10): 523-530.
- [5] Pérez-Parallé M L, Carpintero P, Pazos A J, et al. The hox gene cluster in the bivalve mollusc *Mytilus galloprovincialis* [J]. *Biochemical genetics*, 2005, 43(7-8): 417-424.
- [6] Peltenburg L, Murre C. Engrailed and Hox homeodomain proteins contain a related Pbx interaction motif that recognizes a common structure present in Pbx [J]. *The EMBO journal*, 1996, 15(13): 3385.
- [7] Bourbon H-M, Martin-Blanco E, Rosen D, et al. Phosphorylation of the *Drosophila engrailed* protein at a site outside its homeodomain enhances DNA binding [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270(19): 11130-11139.
- [8] Manzanares M, Marco R, Garesse R. Genomic organization and developmental pattern of expression of the *engrailed* gene from the brine shrimp *Artemia* [J]. *Development*, 1993, 118(4): 1209-1219.
- [9] Condrón B G, Patel N H, Zinn K. *Engrailed* controls glial/neuronal cell fate decisions at the midline of the central nervous system [J]. *Neuron*, 1994, 13(3): 541-554.
- [10] Joyner A L. *Engrailed*, *wnt* and *pax* genes regulate midbrain-hindbrain development [J]. *Trends in Genetics*, 1996, 12(1): 15-20.
- [11] Ahzhanov A, Kaufman T C. Evolution of distinct expression patterns for *engrailed* paralogues in higher crustaceans (malacostraca) [J]. *Development genes and evolution*, 2000, 210(10): 493-506.
- [12] Lowe C J, Wray G A. Radical alterations in the roles of homeobox genes during echinoderm evolution [J]. *Nature*, 1997, 389(6652): 718-721.
- [13] Logan C, Hornbruch A, Campbell I, et al. The role of *engrailed* in establishing the dorsoventral axis of the chick limb [J]. *Development*, 1997, 124(12): 2317-2324.
- [14] Moshel S M, Levine M, Collier J. Shell differentiation and *engrailed* expression in the *ilyanassa* embryo [J]. *Development genes and evolution*, 1998, 208(3): 135-141.
- [15] Wanninger A, Haszprunar G. The expression of an engrailed protein during embryonic shell formation of the tusk-shell, *antalis entalis* (mollusca, scaphopoda) [J]. *Evolution & development*, 2001, 3(5): 312-321.
- [16] Jacobs D K, Wray C G, Wedeen C J, et al. Molluscan *engrailed* expression, serial organization, and shell evolution [J]. *Evolution & development*, 2000, 2(6): 340-347.
- [17] Maures T J, Duan C. Structure, developmental expression, and physiological regulation of zebrafish igf binding protein-1 [J]. *Endocrinology*, 2002, 143(7):

- 2722-2731.
- [18] Hui C C, Matsuno K, Ueno K, et al. Molecular characterization and silk gland expression of bombyx *engrailed* and invected genes [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1992, 89(1): 167-171.
- [19] Logan C, Hanks M, Noble-Topham S, et al. Cloning and sequence comparison of the mouse, human, and chicken *engrailed* genes reveal potential functional domains and regulatory regions [J]. Developmental genetics, 1992, 13(5): 345-358.
- [20] Ekker M, Wegner J, Akimenko M A, et al. Coordinate embryonic expression of three zebrafish *engrailed* genes [J]. Development, 1992, 116(4): 1001-1010.
- [21] Gay N J, Poole S, Kornberg T. Association of the drosophila melanogaster *engrailed* protein with specific soluble nuclear protein complexes [J]. The EMBO journal, 1988, 7(13): 4291.
- [22] Gibert J M. The evolution of *engrailed* genes after duplication and speciation events [J]. Development genes and evolution, 2002, 212(7): 307-318.

Identification of two *engrailed*-homologs in *Crassostrea gigas* and their potential involvement in larval shell formation

HUANG Xiao-hong^{1, 2}, HUAN Pin¹, LIU Bao-zhong¹

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Received: Nov., 15, 2014

Key words: whole mount *in situ* hybridization; *engrailed*; *Crassostrea gigas*; development; larva

Abstract: *engrailed*, a homeodomain-containing gene, functions in segmentation, limb development, central nervous system development and larval shell formation in many species. In the present study, we cloned two *engrailed*-homologs in *Crassostrea gigas* and designated them as *cgi-eng1* and *cgi-eng2*. The expression patterns of the two *engrailed*-homologs were investigated in early D-veligers, which represented one crucial stage of shell development, using whole mount *in situ* hybridization (WMISH). The results showed that the two genes were highly expressed in the edge of shell field, indicating that *cgi-eng1* and *cgi-eng2* might participate in larval shell formation. Moreover, different expression patterns of *cgi-eng1* and *cgi-eng2* indicated potential function differentiations of the two genes. This study firstly identified two *engrailed*-homologs in *C. gigas* and predicted their potential roles in larval shell formation, which might shed new light on studies of early development of mollusks and molecular mechanisms of larval shell formation.

(本文编辑: 梁德海)